République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr Yahia FARES de MEDEA

Faculté de Technologie

Département Génie des Procédés et Environnement

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Filière: Génie des procédés pharmaceutiques

Spécialité : Génie des procédés pharmaceutiques

Thème

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS D'AGRUMES.

Dirigé par :

Dr. Youcef Ettomi Khadidja

Présenté par :

Bouaichaoui Amina

Promotion: 2019/2020

مـــلـخـص

يهدف هذا العمل الى دراسة الخصائص الفيزيوكيميائية و تقييم الفعالية المضادة للأكسدة والميكروبات للمركبات الفينولية المستخرجة من قشر البرتقال (*C. sinensis*). من أجل زيادة إنتاجية الاستخلاص للمركبات الفينولية ، سيكون من المثير للاهتمام تغيير بعض المتغيرات التجريبية مثل درجة حرارة الاستخراج (النقع الساخن والبارد) ، حالة الكتلة الحيوية النباتية (الجافة / الطازجة) ، المذيبات المستخدمة ونسبة الوزن ووقت الاستخلاص. أظهرت نتيجة تقدير المحتوى المائي أن قشور البرتقال غنية بالماء (74٪). يتم تحديد إجمالي محتويات البوليفينول والفلافونويد الكلي بواسطة طريقة كاشف Folin-Ciocalteu وباستخدام كلوريد الألومنيوم AlCl3 ، على التوالي. في حين أَن تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الفينولية يتم تحديده عن طريق قياس قوة محاصرة الجذر DPPH.

الكلمات المفتاحية: قشور البرتقال ، المركبات الفينولية ، النقع ، التحسين ، الأنشطة البيولوجية.

Résumé

Cette étude a pour objectifs la caractéristation physico-chimique et l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques extraites à partir des écorces d'oranges *(C.sinensis).* Afin d'augmenter le rendement d'extraction des composés phénoliques, il serait intéressant de changer quelques paramètres expérimentaux tels que la température d'extraction (macération à chaud et à froid), l'état de la biomasse végétale (sèche/fraiche), les solvants utilisés, le rapport pondéral et le temps d'extraction. Le résultat de la détermination de la teneur en eau a montré que les écorces d'oranges sont riches en eau (74%). Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïde totaux sont à déterminer par la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu et par l'utilisation des chlorures d'aluminium $AlCl_3$, respectivement. Alors que, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques est à déterminer par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.

Mots clés: Ecorces d'oranges, composés phénoliques, macération, optimisation, activités biologiques.

Abstract

The objectives of this study are the physicochemical characterization and evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of phenolic compounds extracted from orange peels (C. sinensis). In order to increase the extraction yield of phenolic compounds, it would be interesting to change some experimental parameters such as the extraction temperature (hot and cold maceration), the state of the plant biomass (dry / fresh), the solvents used, the weight ratio and the extraction time. The result of the determination of the water content showed that the orange peels are rich in water (74%). The total polyphenol and total flavonoid contents are to be determined by the Folin-Ciocalteu reagent method and by the use of aluminum chlorides AlCl3, respectively. Whereas, the evaluation of the antioxidant activity of phenolic extracts is to be determined by measuring the scavenging power of the DPPH radical.

Key words: Orange peels, phenolic compounds, maceration, optimization, biological activities.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie le Dieu Tout-Puissant le nombre d'atomes de l'univers dans les cieux et la terre et entre eux, il m'a aidé à surmonter toutes les difficultés qui ont fait face à ma longue carrière scolaire et m'a donné le courage et la santé pour terminer ce travail.

Je remercie vivement ma promotrice Mme Youcef Ettoumi Khadidja pour sa générosité, sa patience, son aide tout au long de ce travail.

C'est avec un grand respect que je transmets mes remerciements au membres de jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je tiens également à remercier tous les enseignants qui ont suivi ma carrière universitaire sans oblier tous ceux qui m'ont aidé dans les laboratoires du hall technologique de l'université Dr Yahia Farès de Médéa.

Et à la fin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace



TABLE DE MATIERE

Résumé
Remerciements
Dédicace
Table des matières
Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des symboles et abréviations

INTRODUCTION GENERALE. 1

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 1

I.1 Introduction 2

I.1 Agrumes 2

I.1.1 Généralité sur les agrumes 2

I.1.2 Description botanique des agrumes 3

I.2 Orange (*Citrus sinensis*) 4

I.2.1 Définition 4

I.2.2 Anatomie d'orange 4

I.2.3 Composition chimique et valeur nutritive d'orange 4

I.3 Ecorces d'agrumes 4

I.3.1 Définition 4

I.3.2 Composition d'écorce d'agrumes 5

I.4 Composés phénoliques 5

I.4.1 Composés phénolique - quels sont-ils? 5

I.4.2 Structures et classifications des composés phénoliques 6

I.4.3 Distribution alimentaires 9

I.4.4 Rôle physiologique des composés phénoliques chez les pantes 10

I.4.5 Activités biologiques et utilisation des composés phénoliques chez l'homme 11

I.4.6 Applications industrielles des polyphénols 11

I.4.7 Méthode d'éxtraction des composés phénoliques 13

II. CHAPITRE II:ETUDE EXPERIMENTALE 15

II.1 Introduction 15

II.2 Produits et matériel 15

II.3 Matière végétale 15

II.4 Détermination de la teneur en eau 16

II.5 Pré-traitement des échantillons 16

II.5.1 Séchage 16

II.5.2 Broyage et tamisage 17

II.6 Extraction des composés phénoliques 17

II.6.1 A partir l'échantillon sèche 17

II.6.2 A partir de la matière fraiche 19

II.7 Détermination de la teneur en composés phénoliques 19

II.7.1 Dosage des polyphénols totaux 19

II.7.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux 20

II.8 Evaluation de l'activité biologique 20

II.8.1 Evaluation de l'activité antioxydant par DPPH 20

II.8.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne 21

CONCLUSION GENERALE.... ..... **22**

Références bibliographiques

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I-1: Classification des agrumes	**3**
Figure I-2 : Les principales molécules bioactives d'écorce+ la pulpe d'agrumes après leur pressage	**5**
Figure I-3: Structure du noyau phenol	**6**
Figure I-4 : Structure chimique de l'hydroquinol	**6**
Figure I-5 : Structures chimiques de stilbènes (a) et le resvératrol (b)	**7**
Figure I-6: Structure chimique des lignanes	**8**
Figure I-7 : Structure de trois monolignols : 1-alcool paracoumarylique, 2- alcool coniférylique et 3-alcool sinapylique	**8**
Figure I-8 : Structure de base de tanin condensé (a), structure chimique de différents tanins hydrosolysables (b)	**9**

CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE

Figure II.1:Séchage des écorces d'orange	**16**
Figure II.2: Protocole expéreimentale d'extraction des composés par la macération à froid	**18**
Figure II.3: Protocole expéreimentale d'extraction des composés à partir d'une matière fraiche.	**19**
Figure II.4: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	**21**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1: Sources alimentaires des composés phénoliques	**10**
Tableau I-2 : Principales propriétés fonctionnelles des composés phénoliques des écorces d'agrumes et leurs applications industrielles associées	**11**
Tableau II.1: Les principaux produits et matériels	**15**

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

ACN:Anthocyanes

AlCl3: chlorure d'aluminium

BHT : Butylatedhydroxytoluene

BHA : Butylatedhydroxyanisole

bs: base sèche

° C : Degré Celsius

DA: dalton

EAU : Extraction assistée par ultrasons

ED: Eau Distillée

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

ERN : Espèces réactives de l'azote

ESC: Extraction par solvant conventionnel

FAO .Food and Agriculture Organization),

FA : fibre alimentaire

HE : Huile Esentielle

ha : hectar

IC50% : Concentration Inhibitrice à 50% de DPPH perdu

MAE : Extraction assistée par micro-ondes

min: minute

mg EAG/g d'extrait : milligrame déquivalent d'acide gallique par gramme d'extrait

MADRP : Ministère de l'Agriculture, du Dévloppement Rural et de la Pêche

MS: métabolite secondaire

MT : million de tonnes

NADPH:Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

OMS : L'Organisation mondiale de la santé

PT : phénols totaux

tr/min: tours par minute

TBHQ : tertiaire butyl hydroquinone

UI : Unité internationale

UV : Ultrat violet

v/v: volume par volume

WRAP : Waste Resources Action Programmes

Introduction générale

Ces dernières années, la valorisation des coproduits de fruits et légumes suscite un intérêt croissant en raison de leur contenu en composés bioactifs potentiels. Ces coproduits peuvent se former à n'importe quel stade de la chaîne d'approvisionnement alimentaire (pendant la production, après la récolte et surtout pendant le processus d'extraction de jus industrie [1]

Les écorces d'agrumes par exemple, sont un gisement riche en composés biologiquement actifs. Elles sont riches en vitamine C, les huiles essentielles et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques en particuliers les flavonoïdes [2] qui ont une grande importance grâce à leurs diverses vertus et applications dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique. [3].

L'extraction de principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction de composés phénoliques de source végétale [4] .Une méthode d'extraction idéale doit être quantitative, non destructive et efficace dans le temps [5].

C'est dans cette optique que se situe notre travail qui est pour objectifs l'étude physicochimique et l'évaluation biologique des composés phénoliques des écorces d'orange (*Citrus sinensis),* en réalisant une extraction conventionnelle qui est la macération à différentes condition opératoires.

Pour cela, Cette étude comporte trois parties : Dans la première partie nous présenterons une revue bibliographique détaillée des connaissances sur les agrumes, en particulier l'orange douce, et sur les composés phénoliques.

La deuxième partie est intitulé « matériels et méthodes » exposera la matière première, les dispositifs expérimentaux et les différentes analyses physico-chimiques utilisés dans le cadre de ce travail.

La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats ainsi que leurs interprétations et discussion.

Et en conclu notre travail par une conclusion générale et quelques perspectives.

Chapitre I:

Synthèse bibliographique

I.1 Introduction

La philosophie selon laquelle les aliments peuvent favoriser la santé au-delà de leur valeur nutritionnelle est de plus en plus acceptée dans l'espace public et parmi la communauté scientifique alors que la recherche croissante relie les composants du régime alimentaire / des aliments à la prévention et au traitement des maladies[6] .Cette conviction était déjà celle d'Hippocrate, dont l'œuvre contient de nombreux plaidoyers en faveur d'une nourriture saine et qui allait jusqu'à dire : « Que ton aliment soit ton seul médicament ».[7]

Une déclaration précieuse et largement acceptée «la santé c'est la richesse» est reconnue globalement.la santé d'une personne est définie à partir des attributs qualitatifs et quantitatifs du la prise de nourriture [8].Par conséquent, Les tendances alimentaires actuelles dans le monde sont alignées sur la consommation saine et durable de produits naturels, tels que les fruits et légumes. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande un apport minimum de 600 g / personne / jour de fruits et légumes. [9]

Les fruits ont fait l'objet de recherches approfondies ces dernières années en raison de leur importance pour l'agriculture et l'alimentation humaine [10] .Elle sont des aliments attrayants et nutritifs, en raison de leur couleur, forme, goût et odeur spécifiques, enrichis minéraux, vitamines et autres composants bénéfiques [11]. Dans ce scénario, les agrumes sont une riche source de nutriments et des composés actifs et bénéfique pour la santé d'homme (la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les limonoïdes, huiles essentielles) [12], qui ont longtemps été considérés comme faisant partie d'un régime nutritif et engageant [13].

I.1 Agrumes

I.1.1 Généralité sur les agrumes

Les agrumes, qui sont l'un des plus d'importantes cultures commerciales cultivées sur tous les continents du monde, ont reçu de l'attention non seulement pour leurs propriétés nutritionnelles mais aussi pour leur valeur médicinale. [14]

Le mot agrume est un mot d'origine italienne, qu'il provient du latin acrumen (une substance à saveur aigre) qui donne aigruns, egrum, agrum «fruits aigres » [15] (désignant « fruit aigre, arbre portant des fruits aigres »). [16]

Dans la mythologie grecque, les agrumes sont appelé hesperides. L'origine suggérée des vrais agrumes est l'Asie du Sud-Est, y compris le sud de la Chine, nord-est de l'Inde et

Birmanie[17] où ils étaient déjà cultivés il y a plus de 4000 ans [18].Les agrumes sont largement cultivés dans la plupart des régions avec des climats tropicaux, subtropicaux et subtropicaux / tempérés limite. [19]

I.1.2 Description botanique des agrumes

Les agrumes sont des angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Sapindales et à la famille des Rutacées (sous-famille des Aurantioideæ, tribu des Citreæ, sous-tribu des Citrinæ). [20] .Cette famille comprend environ 160 genres et 1650 espèces composées d'arbres et d'arbustes [21]. Les vrais agrumes ont six genres: Clymenia, Eremocitrus, Microcitrus, Poncirus, Fortunella et Citrus. [19]

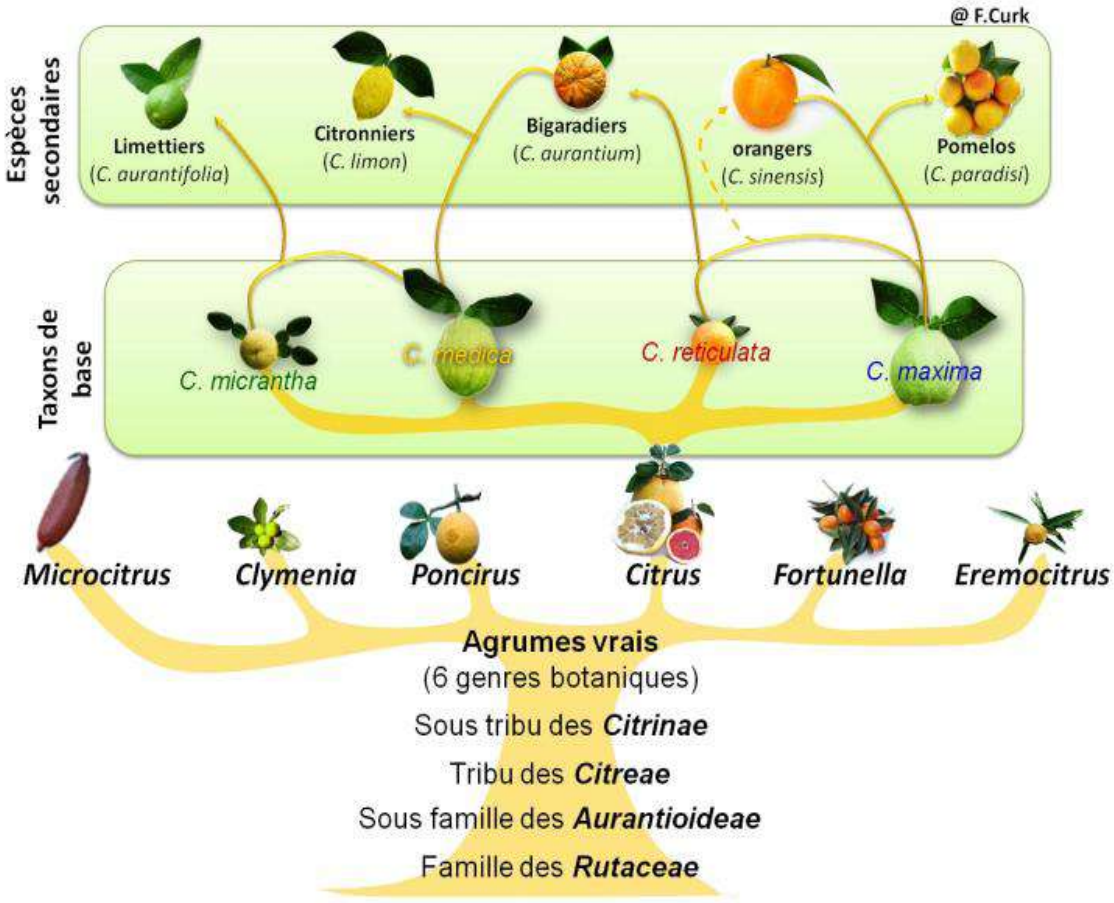


Figure I-1: Classification des agrumes [22]

I.2 Orange (*Citrus sinensis*)

I.2.1 Définition

D'une hauteur de 2 à 3 m et d'une durée de vie de 300 à 400 ans, les orangers prospèrent dans les régions tempérées disposant d'un hiver doux. Ils ont besoin de beaucoup de soleil, de chaleur et d'eau. L'amplitude thermique de son environnement (= différence de température entre l'été et l'hiver et entre le jour et la nuit) est importante pour le développement correct de la saveur et de la couleur de ses fruits [23].l'oranger (C. sinensis) est un hybride natural issu du croisement entre le pamplemoussier (Citrus maxima) et le mandarinier (Citrus reticulata). [24]

I.2.2 Anatomie d'orange

D'un point de vue botanique, Un hesperidium est une baie à croûte coriace composée du péricarpe.Le péricarpe est composé de trois couches distinctes: l'exocarpe (flavedo), qui est la couches ou la peau externes colorées, le mésocarpe (albédo), la couche blanche interne de la peau et l'endocarpe, qui est la couche interne entourant l'ovaire creusé et les graines qui les contiennent. [25]

I.2.3 Composition chimique et valeur nutritive d'orange

Avec plus de 85 % d'eau, l'orange est un fruit particulièrement juteux et désaltérant. C'est dans cette eau de constitution que se trouvent, sous forme dissoute, les principaux éléments nutritifs. [26]

Dans ce contexte, l'orange possède d'importants composants nutritionnels, tels que les acides aminés, les glucides, les fibres, les protéines, les vitamines et les minéraux. Cet agrume est historiquement le fruit le plus consommé (77,3 g / personne / jour) et connaît une évolution favorable de la consommation depuis 2000.

I.3 Ecorces d'agrumes

I.3.1 Définition

Les écorces d'agrumes peut-être définie comme le coproduit solide qui reste après que le fruit frais soit pressé pour l'obtention du jus [27] et ce qui représentent à eux seuls près de 50% de la masse de fruits humides [28]. Ce résidue est composé d'une partie externe (flavedo)

particulièrement riche en huiles essentielles et caroténoïdes et la partie spongieuse interne (albédo) qui est riche en pectine et en phénols. [29] Comme le montre la figure suivante.

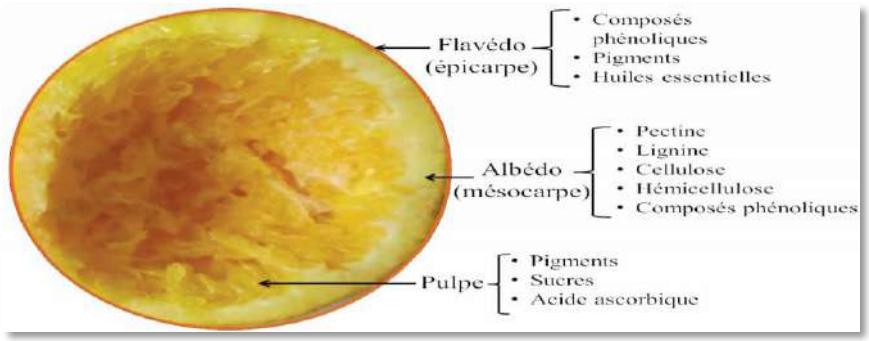


Figure I-2 : Les principales molécules bioactives d'écorce+ la pulpe d'agrumes après leur pressage [30]

I.3.2 Composition d'écorce d'agrumes

La valorisation des coproduits nécessite la connaissance de leur composition chimique. [31]. La composition des écorces d'agrumes est susceptible de varier sous l'influence de divers facteurs qui sont déjà détaillés précédemment.

Les écorces d'agrumes sont très périssables et provoquent une croissance rapide des moisissures en raison de sa forte teneur en **eau** (2,97-3,79 g d'eau / g de base sèche, soit 60% à 75% en base humide [32]). Elles contiennent des niveaux de **sucres solubles** (6,52 à 47,81g /100g bs), de **minéraux** (2,52 à 10,03g /100 g bs) et de protéines (1,79-9,0 g/100g bs). Ces coproduits est une source importante des HEs (0,6 à 1%), alors que les **lipides** sont présents en petites quantités (0,48 à 4 g /100g bs). En outre, les écorces d'agrumes contient des **pigments**, essentiellement des caroténoïdes (0,01-0,20g/100g bs). De plus, plusieurs études montrent que la pelure d'agrumes contient également des composés biologiquement actifs tels que des **FA**s (6,30-42,13g/100g bs), la **vitamineC** (0,109-1,150g/100g bs) et les **composés phénoliques** (0,67 à 19,62g/100g bs). [33]

I.4 Composés phénoliques

I.4.1 Composés phénolique - quels sont-ils?

Les phénoliques sont des composés possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles [34] et incluant divers groupes fonctionnels dérivés [35] ou divers substituant (groupes alkyles, glygosyles, acides organiques etc.…). Ils sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants de

végétales, avec plus de 8 000 structures phénoliques actuellement connues, allant de simples molécules sous forme d'acides phénoliques à des substances hautement polymérisées telles que les tanins. Les composés phénoliques phénoliques sont également appelés polyphénols [36].En effet, le terme polyphénol a été introduit en 1980, en remplacement du terme ancien de tanin végétal, et a été défini par comme suit : « Composes phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de precipiter les alcoïdes, la gélatine et autres proteines. ». [37]

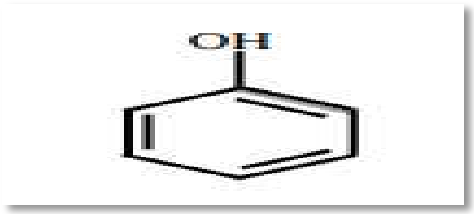


Figure I-3: Structure du noyau phenol [38]

I.4.2 Structures et classifications des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent se regrouper en plusieurs classes selon la complexité du squelette carboné, le degré de modification de ce squelette (méthylation, hydroxylation…) et les liaisons possibles avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites). [39]

-Les polyphénols sont classés en deux grandes classes: les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

I.4.2.1 Composés non flavonoides

a. Les phénols simples

Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique.On trouve parmi les phénols simples, l'hydroquinol, le pyrocatéchol et le phloroglucinol. [37]

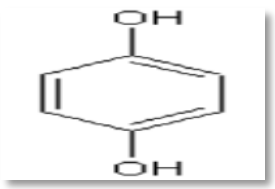


Figure I-4 : Structure chimique de l'hydroquinol [40]

b. Acide phénolique

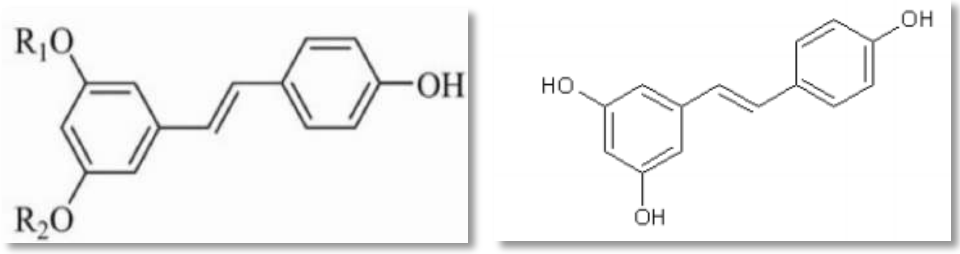
Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires largement répartis dans tout la règne végétale [41].Il sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes [42] qui possèdent un groupe fonctionnel acide carboxylique et qu'ils se composent de deux sous-groupes: acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique [43] à base de squelettes C6– C1 et C6 – C3. Les acides phénoliques présents dans les plantes sous forme d'esters, de glycosides ou d'amides, mais rarement sous forme libre [44]. La variation structurelle des acides phénoliques dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique. [45]

c. Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C6-C3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo-α-pyrone et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. [46]

d. Stilbènes

Sont des composes polyphenoliques qui ont une structure C6-C2-C6 [37] .Ils sont structurellement caractérisés par la présence d'un Noyau de 1,2-diphényléthylène avec des groupes hydroxyle substitué sur les cycles aromatiques [43]. Ces polyphénols sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales, ce qui a été démontré pour le trans- resvératrol. [37]



(a) (b)

Figure I-5 : Structures chimiques de stilbènes (a) [34] et le resvératrol (b) [40]

e. Lignanes

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)2, l'unité (C6- C3) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques [47]. Elles sont présentes dans la nature à l'état libre, tandis que leurs dérivés glycosidiques sont peu répandus [30].On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes. [47]

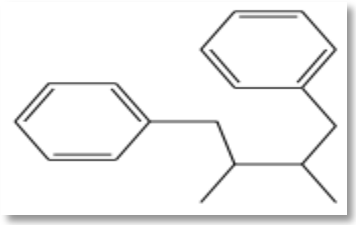


Figure I-6: Structure chimique des lignanes [48]

f. Lignine

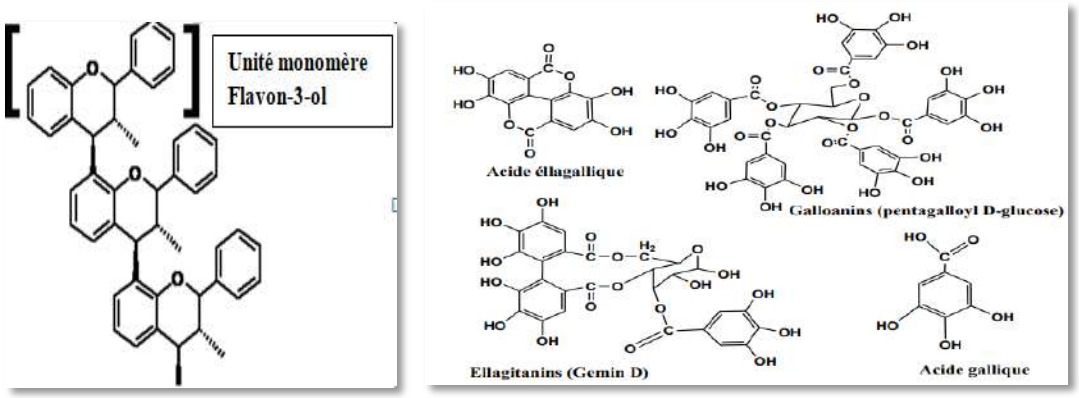
Les acides cinnamiques sont également présents dans les voies vers d'autres métabolites basés sur les éléments constitutifs C6-C3.Un exemple important est lignin. Les lignines sont des polymères de monolignols. Il existe au moins trois types de monomères différents : l'alcool coumarylique ; l'alcool conifférylique; l'alcool sinapylique. [49]



Figure I-7 : Structure de trois monolignols : 1-alcool paracoumarylique, 2- alcool conifférylique et 3-alcool sinapylique [49]

g. Tannin

Les tanins, les composés de poids moléculaire relativement élevé trouvé dans les complexes avec des alcaloïdes, des polysaccharides et protéines, sont un groupe de polyphénols solubles dans l'eau. Ils peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et condensés. Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique ou de l'acide ellagique [50] (gallo- et ellagi-tanins), tandis que les tanins condensés (également appelés proanthocyanidines) sont des polymères de monomères de polyhydroxyflavan-3-ol [43]



(a) (b)

Figure I-8 : Structure de base de tanin condensé (a) [51], structure chimique de différents tanins hydrosolysables (b) [48]

I.4.2.2 Flavonoide

Le terme "flavonoïde" proviendrait de "flavedo", qui désigne la couche externe des écorces d'oranges [52] ou 'flavus qui signifie jaune'[53] selon d'autres auteurs. Les flavonoïdes sont un groupe omniprésent de substances polyphénoliques présentes dans la plupart des plantes. Ils sont un composant colorant majeur des plantes à fleurs [54].

I.4.3 Distribution alimentaires

Les fruits et légumes présentent plusieurs intérêts, faible densité énergétique, apport de fibres, minéraux et vitamines, mais ils sont aussi sources d'une grande variété de composés bioactifs appelés phytomicronutriments. [55]

En effet, le corps humain ne peut pas fabriquer ces micronutriments, ils doivent donc être fournis dans l'alimentation équilibrée [135]. Parmi ces phytomicronutriments, les polyphénols sont de loin les plus abondants et les plus consommés [55] (plus de 500 différentes molécules sont connues dans les aliments [56]) oú un moyen pour un apport d'environ 1 g par jour a été signalé. [56]

De plus, ils sont des constituants répandus des aliments végétaux (fruits, légumes, céréales, olive, légumineuses, chocolat, etc) et les boissons (thé, café, etc) [34]. Dans les aliments, les polyphénols sont rarement présents sous forme libre (dite « aglycone ») mais le plus souvent sous forme d'esters (cas des acides phénoliques), de glycosides [55] afin d'assurer leur solubilité dans l'eau et favoriser leur absorption par les organismes [57] ou de polymères (cas des flavonoïdes). [55]

Les flavonoïdes font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Il est estimé que la prise moyenne des flavonoïdes par l'homme est comprise entre 25 mg/jour et 1 g/jour. Les acides phénoliques est aussi les plus représentés et les plus abondants dans notre alimentation [55] tandit que les stilbènes sont présents en faibles quantités [58]. Le tableau suivant donne quelques sources alimentaires des composés phénoliques:

Tableau I-1: Sources alimentaires des composés phénoliques

Composés phénoliqsue	Sources alimentaires
Acide phénolique Acide caféique Acide cinnamique Acide férulique Acide gualiques	Mangues, baies, pomme, prunes cerise, kiwi, orange, pamplemouse, jus de cerise, jus de pomme, citron, pêche, oignons, thé, café, farine de blé entier, de riz de mais et avoinemyrtille, canneberge, poire, cerise (sucré), pomme de terre, laitue, épinard, plante ligneuse
Flavonoïde, flavanol (catéchismes,et epicatechine) ,Anthocyane ,naringénins Flavones, Flavanone, Isoflavane	Orange, Pamplemousse, pomme, raisins, fraise, abricot, petites fruits (cassis, framboise, mûre), légumes (oignon, brocoli, poivron vert, tomate, choux, paricot), céréales (soja, herbe), légumineuses, produit laitiers, plantes médécinales, thé, chocolate noire, persil, céleri, menthe, feuilles de cacao, tisanes, plantes aromatique
Stilbènes	Faible quantité en alimentation humain, raisin, baies, archides
Tannins	Raisin, jus du pomme, fraise, framboises, grenade noix, raisin in muscadine, pêche, mûre, olive, prune, pois aux noirs lentilles, haricot, chocolat, thé, cidro café, fruits imatures
Lignanes	Lin, céréale, grunes, fruits et certain vegetaux

I.4.4 Rôle physiologique des composés phénoliques chez les pantes

Les plantes (fruits, légumineuses, céréales, et herbes médicinales et aromatiques) produisent une grande variété de métabolites secondaires (MS) comme les composés phénolique qui peuvent jouer de nombreuses activités biologiques [46] .En effet, ils sont synthétisés par les plantes à la fois dans le développement normal et dans des conditions de stress [59] (telles que les attaques d'agents pathogènes et d'insectes,sécheresse,les rayons UV et les blessures) afin d’accomplir des fonctions précises [60].

I.4.5 Activités biologiques et utilisation des composés phénoliques chez l'homme

Au cours de la dernière décennie, un grand nombre d'études ont été réalisées afin d'identifier les composés bioactifs tel que les composés phénoliques présents dans les différentes parties des Citrus dans une tentative d'acquérir une compréhension plus profonde de la corrélation entre le régime alimentaire, les prestations de santé et un risque réduit de maladies. [61]

Il est important de noter que les sous-produits d'agrumes, écorces, sont des bonnes sources de polyphénols, qui ont été liés à des activités antimicrobiennes, antifongiques, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antioxydantes [62] et d'autres actions physiologiques définies sur le corps humain. [63]

I.4.6 Applications industrielles des polyphénols

Les composés phénoliques (principalement flavonoïdes, acides phénoliques et tannins) constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaire (la conservation et la formulation des aliments), cosmétique et pharmaceutique [64] (la majorité d'entre eux ont des médicaments d'importance économique et industrielle, des arômes et des parfums, des colorants et des pigments, des pesticides et des additifs alimentaires)

Tableau I-2 : Principales propriétés fonctionnelles des composés phénoliques des écorces d'agrumes et leurs applications industrielles associées [29]

Composés	**Famille**	**Propriétés**	**Applications**
Hespéridine	Flavanones	-Activité antivirale. -Activité antimicrobienne modérée contre *Salmonella typhi* et *S.typhimurium*. - Activité antiallergique via l'inhibition de la libération d'histamine. - Agent chimiopréventif contre la cancérogenèse du colon. -Agent hypoglycémiant par la régulation du métabolisme du glucose.	-Préparations pharmaceutiques
Ériocitrine		-Excellente activité anti-obésité.	-Préparations

		- Utilisé dans de nombreux complexes multi-vitaminiques. -Maintenir l'intégrité et la circulation périphérique. -Haute stabilité pendant le traitement et le stockage.	pharmaceutiques
Narinigin		- Boissons aromatisées, bonbons et produits de boulangerie (goût amer). -Stabilisateur d'huile (activité antioxydante et anti- mutagène). -Réduction du taux de cholestérol dans le plasma. - Réduction du risque d'athérosclérose. -Protection des taux plasmatiques de vitamine E. -Amélioration du métabolisme de l'éthanol. -Agent anti-apoptotique.	-Industrie alimentaire. -Préparations pharmaceutiques.
Néohespéridine		- Synthèse des dihydrochalones (douceur)	Industrie alimentaire.
Nobilétine, mandarétine, sinensétine	Flavones polyméthoxylées	Activités pharmacologiques: activité anti-inflammatoire, activation de l'énergie vitale	Préparations pharmaceutiques
Diosmin	Flavones glycosylées	- Ingrédient d'activation de certains médicaments (maladies de l'appareil circulatoire). -Amélioration du tonus musculaire et de la résistance vasculaire aux inflammatoires processus (veineux chronique, insuffisance et arthrite rhumatismale.	Préparations pharmaceutiques
Anthocyanes	Flavonoïdes	- Propriétés organoleptiques: coloration.	-Industrie alimentaire (confiserie, desserts)

Des composés phénoliques	Phénols	-Inhibiteurs de corrosion.	-Industrie pétrochimique. - Industrie du raffinage du pétrole.

I.4.7 Méthode d'éxtraction des composés phénoliques

I.4.7.1 Méthode d'extraction conventionnelle par solvant

L'extraction par solvant conventionnel (ESC) (l'extraction solide-liquide avec divers solvants) est largement utilisée pour la récupération des composés bioactifs en raison de sa simplicité. Parmi les divers procédés utilisés, on compte la macération et l'extraction par Soxhlet:[64]

- ✓ **La macération:** est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction etc. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint. [65] Cette technique traditionnelle est couramment utilisée dans l'extraction des composés phénoliques car c'est la méthode la plus simple et efficace. Cependant, il consomme beaucoup de de solvant et de temps et pour terminer l'extraction. [66]
- ✓ **Extraction par Soxhlet:** La technique d'extraction Soxhlet a été largement utilisée pour extraire de précieux composés bioactifs à partir de diverses sources naturelles et est normalement effectuée à haute température pendant plusieurs heures. Bien que l'extraction de soxhlet nécessite un appareil pas cher et puisse être efficace pour l'extraction de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques, il existe des inconvénients importants par son utilisation, notamment: la dégradation des composés bioactifs due à la lumière, à l'air et à une exposition à des températures élevées. [67]

Généralement, les techniques d'extraction conventionnelle des composés phénoliques sont associées à la limitation mentionnée ci-dessous:

- La longue durée d'extraction [68]
- Des grands volumes de solvant sont dépensés pour l'extraction (qui sont des polluants environnementaux et des risques pour la santé) ce qui implique des coûts et une toxicité plus élevés. [68]
- Les solvants doivent être évaporés, ce qui ajoute des coûts supplémentaires et une perte de qualité [69]
- De plus, le produit final obtenu à partir des méthodes conventionnelles contient un résidu de solvant et également ils ne conviennent pas aux composés thermolabiles et facilement oxydables en raison de la possibilité de dégradation chimique des composés cibles [70]

I.4.7.2 Méthodes émergentes

Actuallement, avec le développement du concept de «chimie verte» au cours des dernières années, les techniques respectueuses de l'environnement deviennent de plus en plus attractives. [69]

De nos jours, il existe un intérêt croissant pour le développement des procédés d'extractions nouvelles et alternatives avec un impact environnemental minimisé,afin de surmonter les inconvénients des techniques d'extraction à base de solvants et une meilleure utilisation des coproduits (comme les écorces d'agrumes), ainsi qu'une amélioration de la qualité et de la sécurité des produits finaux [168].L'extraction assistée par ultrasons (EAU), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) sont quelques-unes des ces techniques modernes. [71]

Chapitre II :

Etude expérimentale

II. Chapitre II:Etude expérimentale

II.1 Introduction

Ce travail expérimental a été effectué au niveau de laboratoire chimie (5) du Hall technologique de l'université de Médéa .Les objectifs principales de cette étude est:

- La valorisation des écorces d'orange doucse (*C. sinensis*) par l'extraction des composés phénoliques en appliquant une méthode d'extraction conventionnelle qui est la macération par deux solvants (l'eau et l'éthanol).
- L'optimisation des conditions opératoires d'extraction tels que la température d'extraction (macération à chaud et à froid), l'état de la biomasse végétale (sèche/fraiche), les solvants utilisés, le rapport pondéral et le temps d'extraction.La détermination des teneurs en:polyphénol totaux, flavonoïde totaux
- Evaluation de l' activité biologique y compris l' activité antimicrobienne et antioxydante des composés phénoliques extraits

II.2 Produits et matériel

Les différents produits et matériel nécessaires pour cette étude expérimentale, sont rassemblés dans le tableau II.1.

Tableau II.1: Les principaux produits et matériels

Produits	Matériel
Eau distillée	Etuve
Ethanol (96%)	Broyeur
Carbonate de sodium	Balance électronique
Trichlorure d'aluminium	Plaque chauffante+agitateur
Acide gallique	Centrifugeuse
Mueller Hinton (bouillon+Agar)	Vortex
Réactif de Folin-ciocalteu	Spectrophotomètre ultraviolet-visible
DPPH	Tamis

II.3 Matière végétale

Nous avons réalisé un échantillonnage sur les oranges provenant du marché de la wilaya de Médéa .Les fruits soigneusement sélectionnés (fruits mûrs et sains), ont été bien lavés par

l'eau de robinet (afin d'éliminer les impuretés) et essuyés avec une serviette propre, puis épluchées.

II.4 Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des écorces d'oranges a été déterminée selon la pharmacopée européenne. La teneur en eau est mesurée par la dessiccation de l'échantillon dans une étuve ventilée à 105°C jusqu'à que le poids devient constant. La teneur en eau est exprimée par rapport à la base humide.

$$T = (mi - mf)/mi * 100 \qquad \text{II-1}$$

Où:

mf: la masse sèche finale des écorces d'orange

mi: la masse initiale des écorces d'orange fraîches

II.5 Pré-traitement des échantillons

II.5.1 Séchage

Le séchage au four est une méthode de pré- traitement utilisée pour éliminer l'humidité des échantillons. Elle est considérée comme l'un des traitements thermiques les plus simples et les plus rapides pour conserver les composés phytochimiques. [72]

Les écorces d'orange (flavedo+albédo) ont été découpées en des petits morceaux et séchées à 70 ° C dans l'étuve pendant 3 jours et à l'abri de la lumière comme le montre la figure II.1:



Figure II.1:Séchage des écorces d'orange

II.5.2 Broyage et tamisage

Les écorces d'oranges séchées sont broyées et tamisées afin d'obtenir une poudre homogène avec une taille de particules allant de 0,2 mm à 0,6mm. La poudre obtenue est conservée dans un flacon en verre bien fermé et étiqueté, à l'abri de la lumière.

II.6 Extraction des composés phénoliques

II.6.1 A partir l'échantillon sèche

II.6.1.1 Macération à chaud

Afin de déterminer le rapport (v/v) optimale du solvant d'extraction qui est constitué d'un mélange deux solvants respecteux d'envirnemment qui sont l'eau et l'éthanol .Une quantité de 5 g de la poudre sèche des écorces d'orange est introduit dans un erlenmeyer contenant 100 ml solvant avec les porcentages de concentration suivant:(eau distillée/éthanol : 50/50 ;70/30;30/70 v/v %). L'ensemble est porté au chauffage dans un bain-marie à l'abri de la lumière, avec une agitation bien modéré pendant 30 min où la température d'extraction est fixée à 60°C pour éviter la dégradation des composés phénoliques au cours du processus de l'extraction. Aprés l'extraction, les extraits sont refroidis à température ambiante puis centrifugés pendant 10 minutes à 10000 tr/min. Le surnageant est conservés à 4°C, et mis à l'abri de la lumière jusqu'à le moment de dosage.

II.6.1.2 Macération à froid

Pour l'extraction par la macération à froid, une quantité de 5 g de la poudre des écorces d'orange est macérée dans 100 ml d'eau distillée et l'éthanol (avec un rapport optimale) pendant 24 heures à température ambiante sous agitation et à l'abri de la lumière. Par la suite, l'extrait obtenu est centrifugé pendant 10 minutes à 10000 tr/min. Le surnageant est conservés à 4°C, et mis à l'abri de la lumière jusqu'à le temps de faire les dosages.Le protocole d'extractin des composés phénoliques par la macération à froid est élucidé dans l'organigramme suivant (figure II.2):

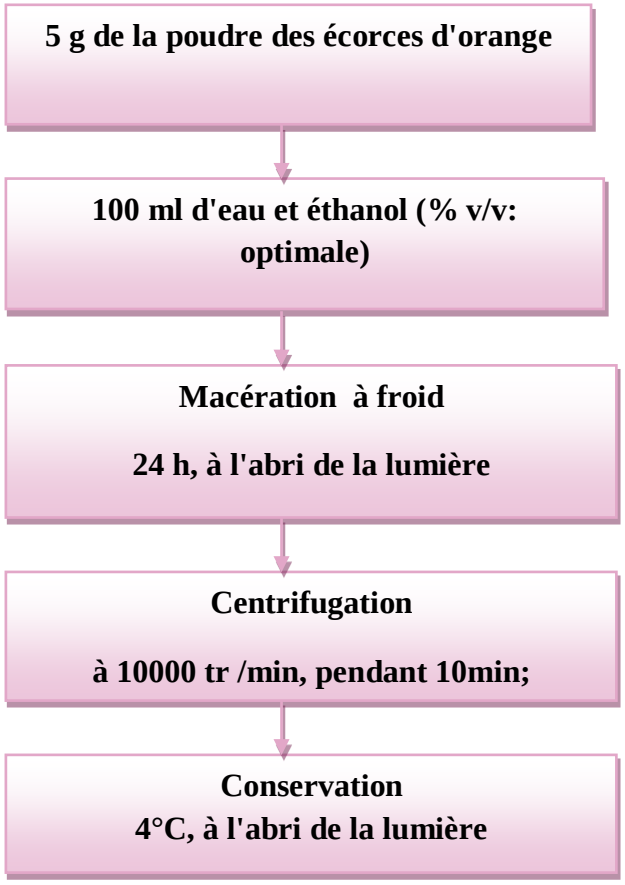


Figure II.2: Protocole expéreimentale d'extraction des composés par la macération à froid

II.6.2 A partir de la matière fraiche

Les protocoles d'extraction à chaud et à froid des composés phénoliques à partir des écorces d'orange **fraîches et rapées** sont résumés dans l'organigramme suivant (figure II.3):

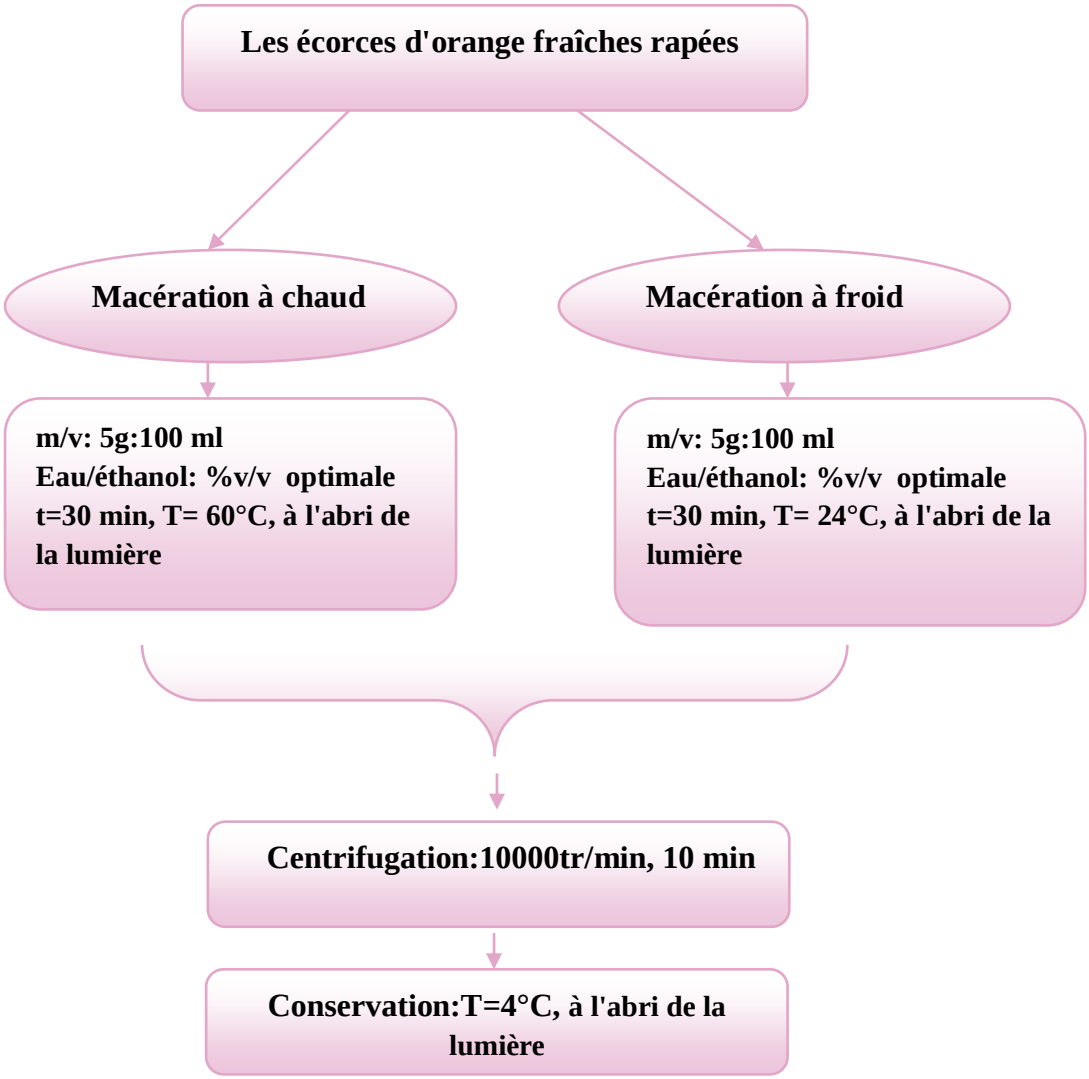


Figure II.3: Protocole expéreimentale d'extraction des composés à partir d'une matière fraiche.

II.7 Détermination de la teneur en composés phénoliques

II.7.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode Folin-Ciocalteu.

Principe

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Cioclateu [73], ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Cioclateu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés. [74]

II.7.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux par la méthode de chlorures d'aluminium

Principe de la méthode

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode de Bahorun et *al*. [75] Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium [76]. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons [77]

II.8 Evaluation de l'activité biologique

II.8.1 Evaluation de l'activité antioxydant par DPPH

Principe de la méthode:

Cette méthode est rapide, simple et peu coûteux et n'est pas spécifique à un composant antioxydant particulier, mais s'applique à la capacité antioxydante globale d'échantillon [162]. Elle est recommandé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH et s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles [178].

Le test de DPPH consiste à mesurer l'activité antiradicalaire par la technique de piégeage du radical au DPPH (2,2'-Diphényl-1picrylhydrazyl). [169]

Le DPPH, ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; poid moléculaire:PM= 394,33), est un radical libre stable soluble dans le méthanol (ou éthanol). D'une couleur violette intense, il présente un maximum

d'absorbance à 517 nm. Lorsqu'une molécule antioxydante réduit le radical DPPH, la couleur violette disparait rapidement pour donner une couleur jaune pâle [169].On peut résumer cette réaction par l'équation suivante: [78]

AH : représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH. (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H. [78]

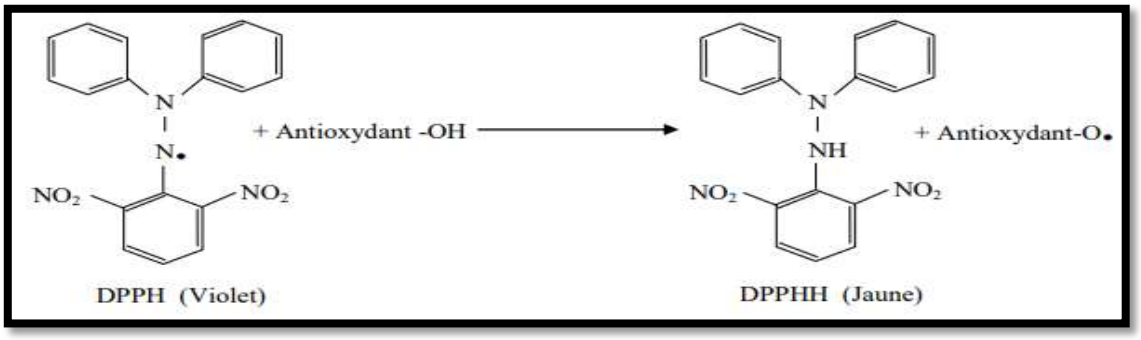


Figure II.4: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [78]

II.8.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques a été réalisée par deux méthodes : des antibiogrammes et celle de dilution en bouillon

Conclusion générale

L'exploitation des coproduits (déchets) agro-alimentaires en vue d'une valorisation a bénéficié au cours de ces dernières années d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales. L'isolement et la caractérisation des composés connus généralement sous l'appellation de « composés bioactifs » constituent une des voies de la valorisation de la biomasse agroalimentaire. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en ingrédients incorporables dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont l'objectif principal est la valorisation d'une biomasse agroalimentaire et en particulier, les écorces d'agrumes. Partant de l'idée d'existence de biomolécules et composés actifs dans la même source végétale.

Ce sujet porte sur l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes et éventuellement à leur caractérisation et évaluation biologique. Notre objectif au premier volet de ce travail consiste à l'optimisation des conditions opératoires d'extraction afin d'avoir un bon rendement en composés phénoliques.

Malheureusement à cause de l'épidémie de COVID-19 on n'a pas pu finir notre travail, espérant qu'un jour quelqu'un d'autre pourra l'achever.

I.1.2 Références bibliographiques

1: Cheaib, D., Raafat, K., & El Darra, N., 2019. Evaluation of phenolic content, antiradical and antibacterial activities of orange and carrot pomace extracts. Bau Journal-Health and Wellbeing, 1(2):1.

2 : Lagha-Benamrouche, S., Addar, L., Bouderhem, H., Tani, S., & Madani, K., 2018. Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. Nature & Technology, (18): 28-35.

3: Hadjira, A., Leila, H., Mohamed, A., & Cherif, A. M., 2011.Dosage de métabolites secondaires d'extraits du fruit Crataegus azarolus L. Tunis. J. Med. Plants Nat, (6): 53-62.

4: Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N., 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.). Nature & Technology, (9): 35-40.

5 : Liew, S. S., Ho, W. Y., Yeap, S. K., & Sharifudin, S. A. B.,2018. Phytochemical composition and in vitro antioxidant activities of Citrus sinensis peel extracts. PeerJ, 6 (1): e5331.

6: Aruoma, O. I., Landes, B., Ramful-Baboolall, D., Bourdon, E., Neergheen-Bhujun, V., Wagner, K. H., & Bahorun, T., 2012. Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. Preventive Medicine, 54, S12-S16.

7 : Jean, S., 2004. L'alimentation ou la troisième médecine. Éditions François-Xavier de Guibert, 5e édition, France.660p.

8 : Aslam, M., 2013. Effect of Natural Growth Promoters on the Nutritive Quality and Antioxidant Attributes of Leafy Green Vegetables .Doctoral dissertation, University Of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.

9 : Montero-Calderon, A., Cortes, C., Zulueta, A., Frigola, A., & Esteve, M. J., 2019. Green solvents and Ultrasound-Assisted Extraction of bioactive orange (Citrus sinensis) peel compounds. Scientific reports, 9(1): 1-8.

10 : Iglesias, D. J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J. M., Naranjo, M. A., Ríos, G., Carrera, E., ... & Talon, M., 2007. Physiology of citrus fruiting. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19(4): 333-362.

11 : Boudries, H., Madani, K., Touati,N.,Souagui, S.,Medouni, S., & Chibane.,M, 2012. Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of Algerian Clementine Cultivars and Mandarin. Afr. J. Biotechnol, (11): 4258–4267

12 : Adnan, M., Umer, A., Ahmad, I., Hayat, K., & Shakeel, S., 2014. In vitro evaluation of biological Activities of Citrus leaf extracts. Sains Malaysiana, 43(2): 185-194.

13 : Nasiruddin, M., Hasan, M. M., Roy, U. K., Islam, A. R., & Islam, M. B., 2019. Quantitative analysis of juice, citric acid, vitamin C content, sugar levels and sugar acid quantitative relation in some cultivated Citrus fruitsm, 4(2):133-137.

14 : Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C., & Menichini, F., 2012. Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(15): 2960-2967.

15 : https://fr.wikipedia.org/wiki/Agrume/ .Consulté le: 27/3/2020.

16 : https://fr.wiktionary.org/wiki/aigrun. Consulté le 26/8/2020.

17 : Abouzari, A., & Nezhad, N. M., 2016. The investigation of Citrus fruit quality. Popular characteristic and breeding. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 64(3): 725-740.

18 : Tran Nguyen, T. T., Le, H. H., Ho, T. M. H., Dogot, T., Burny, P., Bui, T. N., & Lebailly, P., 2020. Efficiency Analysis of the Progress of Orange Farms in Tuyen Quang Province, Vietnam towards Sustainable Development. Sustainability, 12(8): 3170.

19 : Uzun, A., & Yesiloglu, T., 2012. Genetic diversity in Citrus. In: Caliskan M (ed). Genetic diversity in plants: 213-230. InTech.https://doi.org/10.5772/32885.

20 : Audray, D. J., 2015. Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

21 : Nglese, P., Sortino, G., 2019. Citrus history, taxonomy, breeding, and fruit quality. In: Shugart, H.H. (ed.), Oxford Research Encyclopedias of Environmental Science, 1–22. Oxford University Press, Oxford.

22 : Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H., 2020. Citrus limon (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. Plants, 9(1): 119.

23 : https://www.olyaris.com/fr/content/124-huile-essentielle-orange-douce#:~:text=D'une. Consulté le: 26/8/2020.

24 : Handaji, N., Benyahia, H., Arsalane N., Ben Azouz A., Gaboun F., 2013. Evaluation pomologique et organoleptique de 34 variants d'orangers (Citrus sinensis (L.) Osbeck) issus de semis apomictique en essai dans la région du Gharb, "Revue de la recherche agronomique marocaine." Al Awamia, (127): 47-70.

25 : Siddiq, M., Ahmed, J., Lobo, M. G., & Ozadali, F., 2012. Tropical and subtropical fruits: postharvest physiology, processing and packaging. John Wiley & Sons,Inc :656pp. ISBN 978-0-8138-1142-0.

26 : https://genie-alimentaire.com/spip.php?article291.Consulté le: 28/2/2020.

27 : Lakhdara, N., 2014. Les sous-produits de l'agriculture en Algérie. Thèse de doctorat en science :Université Constantine 1 , Institut des Sciences Vétérinaires

28 : Sharma, K., Mahato, N., Cho, M. H., & Lee, Y. R., 2017. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. Nutrition, 34, 29-46.

29 : M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Mihoubi Boudhrioua, N., 2017. Phytochemical characteristics of citrus peel and effect of conventional and nonconventional processing on phenolic compounds: A review. Food Reviews International, 33(6): 587-619.

30 : El Kantar, S., 2018. Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes: extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes .Thèse de doctorat, Compiègne.

31: Rezzadori, K., Benedetti, S., & Amante, E. R., 2012. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. Food and bioproducts processing, 90(4): 606-614.

32 : M'Hiri, N., 2015. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone .Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

33 : M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Mihoubi Boudhrioua, N., 2017. Phytochemical characteristics of citrus peel and effect of conventional and nonconventional processing on phenolic compounds: A review. Food Reviews International, 33(6): 587-619.

34 : Dai, J., & Mumper, R. J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10): 7313-7352.

35 : Hadj Salem, J., 2009. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.

36 : Yu, J.; Ahmedna, M.; Bansode, R.R., 2014. Agricultural by-products as important food sources of polyphenols. In Polyphenols: Food Sources, Bioactive Properties, and Antioxidant Effects; Cobb, D.T., Ed.; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA: 1–32.

37 : Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissèdre, P. L., 2008. Les polyphénols du raisin. Phytothérapie, 6(2): 75-82.

38 : Achat, S., 2013. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de doctorat. Université d'Avignon.

39 : Royer, M.,2013. Étude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs.Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

40: Jain, P., Jain, S., Pareek, A., & Sharma, S., 2013. A comprehensive study on the natural plant phenols: perception to current scenario. Bull Pharm Res, 3(2): 90-106.

41: Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N., 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of medicinal plants research, 5(31): 6697-6703.

42 : Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, 2(12): 1231-1246.

43 : Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., & Delikanli, B., 2014. Phenolics in human health. International Journal of chemical engineering and applications, 5(5): 393.396.

44 : Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules, 18(2): 2328-2375.

45 : Tanase, C., Coşarcă, S., & Muntean, D. L., 2019. A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. Molecules, 24(6): 1182.

46 : Benhammou N, 2012. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du SudOuest Algérien.Thèse de Doctorat, Université Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie.

47 : Belkacem, I., 2017. Stratégies delutte contre les biofilms bactériens responsables d'intoxications alimentaires : polyphénols naturels.Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis –Mostaghanem.

48 : Rhazi, N., 2015. Mise au point de mélanges collants écologiques à partir des écorces d'Acacia mollissima du Maroc .Thèse de doctorat, Université de Pau.

49 : https://en.wikipedia.org/wiki/ Lignin. Consulté le:4/8/2020.

50 : Krief, S., 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris. 375 p.

51 : Uthurry, C. A., Hevia, D., & Gomez-Cordoves, C., 2011. Role of honey polyphenols in health. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 3(4): 141-159.

52 : https://www.havea.com/flavonoides.html. Consulté le:21/3/2020

53 : Malešev, D., & Kuntić, V., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. Journal of the Serbian chemical society, 72(10): 921-939.

54 : Kumar and A. K. Pandey., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview.The Scientific World Journal, vol. 2013, Article ID 162750.

55 : Morand C, Milenkovic D., 2014. Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. Innovations Agronomiques. 42: 47-62.

56 : Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A., 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. European journal of clinical nutrition, 64(3): S112-S120.

57 : Veys-Renaux, D., Reguer, S., Bellot-Gurlet, L., Mirambet, F., & Rocca, E.,2018. Conversion of steel by polyphenolic model molecules: corrosion inhibition mechanism by rutin, esculin, esculetol. Corrosion Science, 136, 1-8.

58 : Pradal, D., 2016. Eco-procédés d'extraction de polyphénols antioxydants à partir d'un co-produit agro-alimentaire. Thèse de doctorat, Lille 1.

59 : Kechebar, M.,& Karoune, S.,& Laroussi K., & Djellouli A.,2017. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Opuntia ficus Indica L. Cladodes Related to Extraction Method. Interational Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 9(6): 744-749.

60 : Debibi, A., Guessaibia, N., Tir-Touil, A., Benrima, A., Meddah, Boumediene ., 2018. Impact de la teneur en polyphénols sur les propriétés physico-chimiques et microbiologiques de trois variétés Algériennes de figues sèches (Ficus carica L.). Nutr. Santé, 7(1): 33-40.

61 : Essadik, F., Habsaoui, A., Kribii, A., Ounine, K., Kribii, A., Rifi, H., 2014. Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits des oranges amères (Citrus aurantium L.). In : Proceedings of « Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué », Rabat : 17-18.

62 : Papoutsis, K., 2018. Optimized conditions for the preparation of citrus by-product aqueous extract enriched in polyphenols and antioxidants .Thèse de doctorat .The University of Newcastle.

63 : Sowmya., & Haraprasad, N., 2019. A comparative study on Phytochemical evaluation of peels of Citrus auriantium, Citrus maxima and Citrus sinensis using different solvents – Profiting Fruit Waste. International Journal of Research and Analytical Reviews, 6(1): 802-806

64 : Bohui, P. S. G., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D.,2018. Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: Azadirachta indica et Psidium guajava. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, 46: 50-58.

65 : Grigoraş, C. G., 2012. Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs.Thèse de doctorat, Université d'Orléans.

66 : Jitrangsri, K., Chaidedgumjorn, A., & Satiraphan, M., 2020. Effect of ethanol percentage upon various extraction methods of peanut based on antioxidant activity with trans-resveratrol and total phenolic contents. Pharmaceutical Sciences Asia, 47 (2): 164-172.

67 : Papoutsis, K., 2018. Optimized conditions for the preparation of citrus by-product aqueous extract enriched in polyphenols and antioxidants .Thèse de doctorat .The University of Newcastle.

68 : Tanase, C., Coşarcă, S., & Muntean, D. L., 2019. A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. Molecules, 24(6): 1182.

69 : Puri, M., Verma, M. L., & Mahale, K., 2012. Processing of citrus peel for the extraction of flavonoids for biotechnological applications. in Flavonoids: Dietary Sources, Properties and Health Benefits, K. Yamane and Y. Kato, Eds., pp. 1–17, Nova Science Publishers,.

70 : Memduha, E., & Onur, D,. 2018. Recovery of Bioactive Phenolic Compounds from Lemon (Citrus limon (L.) Burm. f.) and Orange (Citrus Sinensis L. Osbeck) Pomaces. Chemical and Process Engineering Research, 51:18-33.

71 : Akyol, H., Riciputi, Y., Capanoglu, E., Caboni, M. F., & Verardo, V., 2016. Phenolic compounds in the potato and its byproducts: an overview. International Journal of Molecular Sciences, 17(6): 835.

72 : Azwanida, N. N., 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Med. Aromat. Plants, 4: 1–6.

73: Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M.**,** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Method. Enzymol. 299**:** 152-178.

74 :Boizot N., and Charpentier .J.P.**,**2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu encomposés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra :79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

75 :Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. and Pinkas M**.,** 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittle Forshing. 46 (11):1086-1089.

76 :Boulekbache L., 2005. Profil GC-MS des polyphénols d'une plante médicinale : Eucalyptus globulus. Mémoire de Magister. Université de Bejaïa : 71p.

77 :Ribéreau-Gayon P.**,**1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris. p254.

78 : Hlila, M.B., Ben Saad, A., Ben Jannet, H., Aouni, M., Mastouri, M., & Selmi, Boulbaba, .2017. Etude chimique et biologique des extraits de la plante halophyte Halocnemeum strobilaceum (Pall.) Bieb.Journal of Bioresources Valorization, 2 (1): 42-48.